บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

1. วัสดุอุปกรณ์

3.1.1 บีกเกอร์(Beaker) ขนาด125, 250, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร

3.1.2 หลอดทดลอง (Test tube)

3.1.3 จานเพาะเชื้อ (Petri dish)

3.1.4 เครื่องดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติ (Micropipettes) ขนาด 2 - 20, 20 - 200, 100 - 1,000 และ 1,000 – 5,000 ไมโครลิตร

3.1.5 ไมโครปิเปต ทิป (Micropipettes tip)

3.1.6 ที่ตั้งหลอดทดลอง (Rack for tube)

3.1.7 ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyerflask) ขนาด 125, 250, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร

3.1.8 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol burner)

3.1.9 เข็มเขี่ยเชื้อ (Needle)

3.1.10 แท่งแก้วคนสาร (Stirring Rod)

3.1.11 หลอดเซ็นตริฟิวจ์ (Centrifuge tube) ขนาด 50 มิลลิลิตร

3.1.12 หลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ (Micro-centrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

3.1.13 ขวดดูแรน (Duran) ขนาด125, 200, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร

3.1.14 ขวดปรับปริมาตร (Volumetric flask) ขนาด5, 10, 50, 100 และ 250 มิลลิลิตร

3.1.15 ช้อนตักสารสแตนเลส (Spatula)

3.1.16 คิวเวท (Cuvette)

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

3.1.17 พาราฟิล์ม (Parafilm)

3.1.18 ปากคีบ (Forceps)

3.1.19 กระบอกตวง (Cylinder)

2. เครื่องมือ

3.1.1 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (Autoclave) รุ่น HVE 50 ยี่ห้อ Hirayama

3.1.2 กล้องจุลทรรศน์ (Light microscope) ECLIPSE E 200 ยี่ห้อ Niko

3.1.3 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น S20-K ยี่ห้อ Toledo

3.1.4 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (Precion balance)รุ่น MS 1602S ยี่ห้อ Metter Toledo

3.1.5 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Analytical balance)รุ่น XT 220A ยี่ห้อ Précis

3.1.6 เครื่องเขย่า (Shaker) รุ่น SKO-2D ยี่ห้อ Wiscshake

3.1.7 เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (Centrifuge) รุ่น Legend Mach 1.6 R ยี่ห้อ Thermo Sciencetific

3.1.8 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Optizen POP ยี่ห้อ Mecasys

3.1.9 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow) ยี่ห้อ Boss Tech

3.1.10 เครื่องกวนสารเคมี (Hot plate & stirrer)

3.1.11 ตู้เย็นสำหรับแช่อาหารเลี้ยงเชื้อ รุ่น RT25FGRA ยี่ห้อ Samsung

3.1.12 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น WB-22

3.1.13 เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) ยี่ห้อ Vortex Genie 2

3.1.14 เครื่องกวนสารโดยใช้แม่เหล็ก (Magnetic stirrer) รุ่น Variomag

3.1.15 เครื่องรันเจล (Gel electrophoresis)

3.1.16 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Thermal cycler)

3.1.17 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1.1 Potato Dextrose Agar (PDA)

4. สารเคมี

3.1.1 Lysis buffer

3.1.2 TE buffer

3.1.3 1M Tris-HCl buffer pH 8.0

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

3.1.4 TBE buffer

3.1.5 1M MgCl2

3.1.6 5 M Nacl2

3.1.7 10X TBE Buffer

3.1.8 0.5 M EDTA

3.1.9 2% Agarose gel

3.1.10 dNTP 10 μM

3.1.11 DNA Maker 100 bp

3.1.12 10x ThermoPol buffer

3.1.13 Betaine

3.1.14 Magnesium sulphate

3.1.15 *Bst2* (*Bacillus stearothermophilus*DNA)

3.1.16 Template DNA

3.1.17 SDS 0.01%

3.1.18 RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution

3.1.19 Primer F3 (Forward outer primer)

3.1.20 Primer B3 (Backward outer primer)

3.1.21 Primer FIB (Forward internal primer)

3.1.22 Primer BIP (Backward internal primer)

3.1.23 Primer F (Forward internal primer)

3.1.24 Primer B (Backward internal primer)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่าง

รวบรวมข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับการสำรวจและเก็บตัวอย่างมะม่วงที่มีรอยโรคของเชื้อรา จากร้านค้าในในพื้นที่อำเภอเมือง จังหวัดจันทบุรี จำนวน 20 ตัวอย่าง พิจารณาจำแนกตามลักษณะทางพฤกษศาสตร์ นำตัวอย่างมาสังเกตลักษณะรอยโรคของมะม่วง

2. การคัดแยกเชื้อราบริสุทธิ์

เก็บตัวอย่างผลมะม่วงสายพันธุ์น้ำดอกไม้ที่แสดงอาการของโรคแอนแทรคโนส นำมาแยกเชื้อราด้วยวิธี tissue transplanting โดยล้างชิ้นส่วนของพืชด้วยน้ำไหลเป็นเวลา 15 นาที และตัดชิ้นส่วนผลมะม่วงที่เป็นโรคที่ติดกับชิ้นส่วนปกติเป็นชิ้นขนาด 0.5 x 0.5 เซนติเมตร ฆ่าเชื้อชิ้นส่วนมะม่วงที่ตัดแล้วด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปรคลอไรท์ (sodium hypochlorite) 10 % เป็นเวลา 3 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 3 ครั้ง ซับให้แห้งและนำมาวางบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน คัดเลือกเชื้อราที่มีลักษณะเส้นใย

สีขาวมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ใหม่ และเก็บเชื้อราบริสุทธิ์เพื่อนำไปทดลองในขั้นตอนต่อไป

3. การศึกษาลักษณะของเชื้อรา

การศึกษาลักษณะของเชื้อราด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงบนแผ่นสไลด์ (slide culture) ซึ่งใช้สำหรับศึกษาลักษณะโครงสร้างต่างๆของเชื้อรา โดยเตรียมแผ่นสไลด์มาวางบนแท่งแก้วงอ ใส่ลงไปในจานเพาะเชื้อ และใส่สำลีลงไปด้านข้างของจานเพาะเชื้อนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ จากนั้นตัดอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นชิ้นสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาด 0.5 X 0.5 เซนติเมตร วางบนแผ่นสไลด์ที่เตรียมไว้ และใช้เข็มเขี่ยเชื้อราที่ฆ่าเชื้อแล้วเขี่ยเส้นใยของเชื้อรามาแตะตรงขอบด้านข้างของชิ้นวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บนแผ่นสไลด์ทั้งหมด 4 ด้าน และวางกระจกปิดสไลด์ (cover slip) ลงบนชิ้นวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 5-10 วัน จากนั้นนำไปตรวจลักษณะของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์

4. การสกัดดีเอ็นเอ

เพาะเลี้ยงเชื้อราบริสุทธิ์บนอาหาร PDA เก็บเส้นใยของเชื้อราลงใน microcentrifuge tube สกัดดีเอ็นเอโดยวิธี Bust n’ Grab โดยเขี่ยเส้นใยของเชื้อราลงใน microcentrifuge tube เติม lysis buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บดเส้นใยให้ละเอียด จากนั้นนำไปทำ heat shock โดยแช่ในน้ำแข็งแห้งเป็นระยะเวลา 2 นาที และแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 1 นาที ทำ heat shock ทั้งหมด 3 ครั้ง เสร็จแล้วนำตัวอย่างที่ได้ไปเติม chloroform ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge 3 นาที ที่ความเร็ว 20,000 รอบต่อนาที ดูดส่วนใสที่มีสารพันธุกรรมอยู่ด้านบนของหลอดปริมาตร 400 ไมโครลิตร ลงหลอด centrifuge ใหม่ และเติมเอทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ ที่แช่เย็นไว้ ผสมสารละลายให้เข้ากัน ตั้งหลอด centrifuge ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 5 นาที และนำไปแช่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เวลา 5 นาทีแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 20,000 รอบต่อนาที เวลา 5 นาที ดูดส่วนใสทิ้งล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 20,000 รอบต่อนาที เวลา 5 นาที และดูดส่วนใสทิ้ง นำตะกอนไปทำให้แห้งด้วยการอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 5 นาที เก็บดีเอ็นเอใน TE buffer ปริมาตร 25-50 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (Susanna, Halyna & Kenneth, 2004 : 2)

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

5. การเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายด้วยวิธี loop mediated isothermal amplification (LAMP)

1) ส่วนประกอบของปฏิกิริยา LAMP (ปริมาตร 25 ไมโครลิตร)

dNTP	1.6 mM
*Bst*2	4 U
$MgSO_4$	0.4 mM
10X Thermopol	0.5 M
Betaine	0.5 M
Primer F3	2 μM
Primer B3	2 μM
Primer B	2 μM
Primer F	2 μM
Primer FIP	2 μM
Primer BIF	2 μM

2) เติมดีเอ็นเอแม่แบบที่ได้จากการสกัดดีเอ็นเอลงไปในหลอดที่ผสมสารในข้อ 1) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

3) นำเข้าเครื่อง Dry thermal block เป็นเวลา 60 นาที

4) ตรวจสอบผลผลิต LAMP ด้วยวิธี gel electrophoresis โดยใช้ 2% agarose ที่ผสม redsaft แล้วตรวจดูดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลตด้วยเครื่อง UV transilluminator

การเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายด้วยวิธี loop mediated isothermal amplification (LAMP) ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ *C. gloeosporioides* โดยใช้ยีน glutamine synthetase (GS) (GenBank ID: DQ792872.1) ได้รับการออกแบบโดยใช้ซอฟต์แวร์ PrimerExplorer V4 (http://primerexplorer.jp/e/) (Shuaishuai, W. et al. 2017 : 495) ดังแสดงในตารางที่ 3.1

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

ตารางที่ 3.1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัย (Shuaishuai, W. et al. 2017 : 496)

Primer type	Sequence (5′ -3′)	Length
F3	GCTGCAGCCGGAAAATCC	18 nt
B3	GGCAGACTCGGAGAGACC	18 nt
FIP (F1c + F2)	ACCGGCTCAGCTGCAACGCACACGAGCAAAAGGATACGC	39 nt
BIP (B1c + B2)	TAATGCCTTTCACGACCTGCGGCCGAGGCAATGATTCCTCAA	42 nt
LF	CGGGCCAACGCTGGAAAA	18 nt
LB	GGCGCAACAAAGCTGGG	17 nt

6. การทดสอบความไว (Sensitivity)

ทดสอบความไวของปฏิกิริยา LAMP โดยนำดีเอ็นเอของเชื้อราที่สกัดได้เจือจางแบบลำดับส่วน (10 fold serial dilution) ตั้งแต่ 10^{-1} – 10^{-9} แล้วนำดีเอ็นเอมาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค LAMP จากนั้นนำไปตรวจสอบด้วย 2% Agarose gel electrophoresis

7. การทดสอบความจำเพาะ (Specificity)

เชื้อที่ใช้ทดสอบความจำเพาะ ได้แก่ *Phytophthora palmivora, Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. และ *Rhizobium* sp. โดยเพาะเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 5-10 วัน แล้วนำไปสกัดดีเอ็นเอ จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค LAMP และตรวจสอบด้วย 2% Agarose gel electrophoresis

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี